Dünnschichtchromatographische und gaschromatographische Untersuchungen von Biphenylmetaboliten bei in-vitro-Versuchen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Johannes Beschorner

Saarbrücken

1972

Aus der Emeritus-Abteilung (R. Ammon) des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität des Saarlandes

(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. V. Ullrich)

Dünnschichtchromatographische und gaschromatographische Untersuchungen von Biphenylmetaboliten bei in-vitro-Versuchen

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1 9 7 2

vorgelegt von

Johannes Beschorner

geb. am 2.4. 1943 in Trier

Dekan: Prof. Dr. med. H. Kuhlenkampff

1. Referent: Prof. Dr. phil. Dr. med. R. Ammon

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 7. 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einführung in das Thema und Problemstellung	5
Hauptteil	9
I. Darstellung der Vorversuche und qualitative Erfassung von Biphenylmetaboliten mittels Dünnschichtchromatographie	9
a) Einführung	9
b) Aufarbeitung der Inkubationsmischungen	9
1. Extraktionsmethodik	9
2. Präparative Schichtchromatographie	10
3. Fraktioniertes Ausschütteln	10
c) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	10
1. Fließmittelsysteme und Anfärbemethoden	10
2. Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen	12
II. Quantitative Erfassung von Biphenylmetaboliten mittels Gaschromatographie	13
a) Meßmethodik und Schwierigkeiten bei der Analyse	15
b) Biphenylhydroxylierung bei Kaninchen	16
c) Biphenylhydroxylierung bei Meerschweinchen	21
d) Biphenylhydroxylierung bei Ratten	26

Seite

e) Mikrosomale Hydroxylierung des Biphenyls in Abhängigkeit von der Zeit 32

Zusammenfassung 34

Diskussion 35

Esperimenteller Teil 38

I. Substanzen 38

II. Tiermaterial 39

III. Leberhomogenatherstellung und Inkubationsbedingungen 39

IV. Aufarbeitung der Inkubationsmischungen 41

V. Dünnschichtchromatographie 42

VI. Präparative Schichtchromatographie 45

VII. Gaschromatographie 46

a) Silylierungen mit BSA 47

b) Einwaage der Standardsubstanzen 47

c) Umwandlung der GC-Meßwerte in das Analysenergebnis 49

Literaturverzeichnis 51

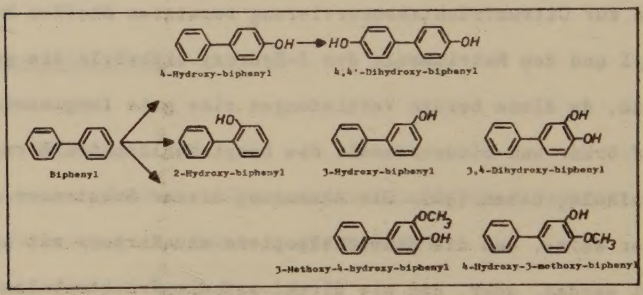
Einführung in das Thema und Problemstellung

In immer größerem Ausmaß werden Citrusfrüchte aus wärmeren Ländern in unsere Breiten eingeführt. Um einen erheblichen Verlust bei ihrer Lagerung und beim Transport zu vermeiden, muß man sie gegen den Befall von Schimmelpilzen mit einem Konservierungsmittel behandeln. Hierzu gibt es viele Möglichkeiten und Vorschläge (30, 6).
Unter allen zur Citrusfrüchtekonservierung benutzten Stoffen kommen dem Biphenyl und dem Natriumsalz des 2-Hydroxy-biphenyls die größte Bedeutung zu, da diese beiden Verbindungen eine gute fungistatische Wirkung auf Grün- und Blauschimmel, die hauptsächlichsten Erreger der Orangenfäule, haben (30). Die Anwendung dieser Substanzen erfolgt in der Weise, daß die Einwickelpapiere und Kartons mit ihnen imprägniert werden, oder, daß sie direkt auf die Fruchtschalen aufgedampft werden. Nach einer solchen Behandlung der Früchte mit Biphenyl kann dieses auch im Saft und im Fruchtfleisch nachgewiesen werden (31). Somit gelangt beim Verzehr dieser Früchte stets Biphenyl in den Körper, und es war deshalb notwendig, Toxizitätsprüfungen durchzuführen. Die hierbei erzielten Ergebnisse hat VAN STRATUM in einer zusammenfassenden Darstellung wiedergegeben (36). Hieraus ist zu entnehmen, daß Biphenyl in der Konzentration, in der es überhaupt in den Körper gelangen kann, als untoxisch angesehen werden kann.

Das Schicksal des Biphenyls im tierischen Körper ist ähnlich dem vieler Arzneimittel: Im arzneimittelabbauenden Enzymsystem der Leberzellen wird es in die in der Abbildung Nr. 1 dargestellten Mono-

und Diphenole umgewandelt (37, 4, 25).*) Die Hydroxybiphenyle werden sodann zum Teil mit Glucuronsäure und Schwefelsäure konjugiert,**) zum Teil auch als solche ausgeschieden.

Abbildung Nr. 1: Die phenolischen Stoffwechselprodukte des Biphenyls.

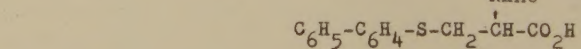


Ob die Hydroxylderivate des Biphenyls während ihres Aufenthaltes im tierischen Organismus eine toxische Wirkung auf diesen ausüben, ist bisher außer beim 2-Hydroxy-biphenyl (1) nicht untersucht worden.

---

*) Die in die Abbildung aufgenommenen Phenole 3-Hydroxy-biphenyl, 3-Methoxy-4-hydroxy-biphenyl sowie 3-Hydroxy-4-methoxy-biphenyl sind erst kürzlich als Metabolite des Biphenyls nachgewiesen worden (28).

**) In geringer Menge konnte im Harn von Ratten Biphenylmercaptursäure nachgewiesen werden (37):



Das für die Hydroxylierungen verantwortliche Enzymsystem ist mehr oder weniger in allen Körperzellen vorhanden. Besonders reichlich jedoch findet man es in den Zellen der Leber, der somit für den Abbau von Arzneimitteln und auch des Biphenyls eine zentrale Bedeutung zukommt. Man weiß heute, daß dieses Enzymsystem nur im endoplasmatischen Retikulum der Zelle vorkommt und die Hydroxylierung durch einen, noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärten Multienzymkomplex, unter Einwirkung von molekularem Sauerstoff und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat katalysiert wird (24, 12, 35, 16). Zur Nomenklatur dieser hydroxylierenden Enzyme wird die Bezeichnung Oxygenasen vorgeschlagen (15).

Eine Hydroxylierung des Biphenyls beschrieb als erster schon 1891 KLINGENBERG (22). Nach Verfütterung von Biphenyl an Hunde konnte er aus dem Urin ein in der para-Stellung hydroxyliertes Biphenyl isolieren und identifizieren. Bei späteren in-vivo-Versuchen wurde gefunden, daß Biphenyl von den verschiedensten Tierarten auch noch in 2-, 4,4'- und 3,4-Stellung hydroxyliert wird (37, 26, 4, 9, 25, 3). Dabei stellte sich heraus, daß die para-Hydroxylierung der Hauptstoffwechselweg der Biphenylmetabolisierung ist und daß dabei die anderen Isomeren in geringerer Menge gebildet werden.

Die ersten in-vitro-Versuche mit einer Mikrosomenfraktion aus Kaninchenleber beschrieben 1956 MITOMA und POSNER (26). Zur Untersuchung der mikrosomalen Hydroxylierung inkubierten sie neben anderen Substraten auch Biphenyl. Sie konnten dabei zwei Hydroxy-

lierungsprodukte nachweisen, 2-Hydroxy-biphenyl und 4-Hydroxy-biphenyl. Auch CREAVEN (9) führte Untersuchungen über die mikrosomale Hydroxylierung des Biphenyls durch und postulierte für die 2- und 4-Hydroxylierung zwei verschiedene Enzymsysteme. Dieses Ergebnis stützte er auch auf Enzyminduktionsversuche (7). Dagegen diskutierten JAFFE und Mitarbeiter nur ein Enzymsystem für diese beiden Hydroxylierungsschritte (18) BACHMANN u. a. (2) untersuchten den Einfluß von Mitochondrien auf die 2- und 4-Hydroxylierung des Biphenyls.

Im hiesigen Institut stellte RAIG (28) bei in-vivo-Versuchen mit Kaninchen, Ratten und Mäusen fest, daß neben den schon bekannten Hydroxylderivaten des Biphenyls auch noch 3-Hydroxy-biphenyl in nicht unbedeutender Menge gebildet wird. Es lag daher nahe, dieses Ergebnis auch bei in-vitro-Versuchen mit einer Lebermikrosomenfraktion nachzuprüfen.
Zur quantitativen Erfassung der Hydroxybiphenyle wurde bisher immer ein fluorometrisches Bestimmungsverfahren angegeben (5, 9, 2). Hiermit können jedoch lediglich zwei Verbindungen gleichzeitig analysiert werden. Dementgegen erlaubt die von RAIG (27) ausgearbeitete gaschromatographische Messung eine quantitative Erfassung aller Hydroxybiphenyle in einem Chromatogramm.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch in-vitro-Versuche mit verschiedenen Tierarten die mikrosomale Hydroxylierung des Biphenyls untersucht werden, besonders im Hinblick auf die 3-Hydroxylierung. Zum Nachweis der phenolischen Biphenylmetaboliten sollte hierbei die Dünnschichtchromatographie und zur quantitativen Bestimmung erstmals die Gaschromatographie angewendet werden.

Hauptteil

I. Darstellung der Vorversuche und qualitative Erfassung von Biphenylmetaboliten mittels Dünnschichtchromatographie

a) Einführung

Zunächst sollte festgestellt werden, ob Biphenyl durch das Hydroxylasesystem der Leberzellen in 3- und 3,4-Stellung hydroxyliert wird.

Die Leberhomogenatherstellung und die Inkubationsbedingungen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von CREAVEN, P. J. und Mitarbeitern (8, 9) durchgeführt, da diese Autoren ihre Methode bei der enzymatischen Hydroxylierung des Biphenyls mit Erfolg angewendet hatten. Eine Biphenyllösung wird hierbei mit dem 10 000 x g-Überstand des Leberhomogenates 45 min bei 38° inkubiert und anschließend die entstandenen Biphenylmetaboliten hieraus durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel isoliert und analysiert.

b) Aufarbeitung der Inkubationsmischungen

1. Extraktionsmethodik

Beim Ausschütteln der angesäuerten Inkubationsmischungen mit den üblichen organischen Extraktionsmitteln (Benzol, Diäthyläther, Cloroform, Pentan und Petroläther) tritt starkes Schäumen auf, wobei sich Emulsionen bilden, so daß sich wässrige und organische Phase nicht mehr voneinander trennen.

Es empfahl sich deswegen, die Extraktion mit Äther in einer Apparatur nach KUTSCHER und STEUDEL (23) vorzunehmen.

2. Präparative Schichtchromatographie

Wegen der geringen Konzentration der Biphenylmetaboliten in den Extrakten neben großen Mengen an Begleitstoffen, ist bei der Probengewinnung für eine spätere gaschromatographische Messung unbedingt eine möglichst reine Darstellung der Phenolfraktion nötig. Um dies zu erreichen, wurde anfangs die präparative Schichtchromatographie angewendet. Diese Art der Aufarbeitung stellte sich jedoch als unbrauchbar heraus, da sich bei der späteren gaschromatographischen Messung zeigte, daß bei der Darstellung der Phenolfraktion Substanzen anderer Stoffklassen mit erfaßt wurden und die Analyse erheblich störten, in manchen Fällen sogar unmöglich machten.

3. Fraktioniertes Ausschütteln

Ein geeignetes Verfahren war die Vortrennung der Ätherextrakte durch fraktioniertes Ausschütteln mit Bicarbonat zur Abtrennung der Säuren und mit Natronlauge zur Gewinnung der Phenolfraktion. Dieses Verfahren zeigte einen besseren Reinigungseffekt als die präparative Schichtchromatographie und eine gute Reproduzierbarkeit.

Der einzige Nachteil dieser Methode ist dadurch gegeben, daß sich beim Ausschütteln mit Natronlauge die organische Phase von der ätherischen Phase sehr schlecht trennt. Um zu vermeiden, daß Neutralsubstanzen mit erfaßt werden, muß die Mischung beider Phasen längere Zeit stehengelassen werden.

c) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

1. Fließmittelsysteme und Anfärbemethoden

Die Phenolfraktion wurde mit Hilfe verschiedener Fließmittelsysteme

dünnschichtchromatographisch untersucht. Die beste Trenneigenschaft für die erfaßten Biphenylmetaboliten zeigte eine Mischung von Benzol, Methanol, Ameisensäure im Verhältnis von 90:9:1. 3-Hydroxy-biphenyl und 4-Hydroxy-biphenyl konnten jedoch in keinem der Fließmittelsysteme voneinander getrennt werden. Der Unterschied in den R_F-Werten der reinen Vergleichssubstanzen beträgt etwa 0,01 - 0,03.

Beim Betrachten der Chromatogramme unter der UV-Lampe bei 254 m/u können vier Flecke den Phenolen 2-Hydroxy-biphenyl, 3-Hydroxy-biphenyl und 4-Hydroxy-biphenyl (1Fleck!), 3,4-Dihydroxy-biphenyl und 4,4'-Dihydroxy-biphenyl zugeordnet werden.
Die endgültige Identifizierung der Biphenylmetaboliten gelingt bei der Behandlung des Chromatogramms mit GIBBS-Reagenz (11). Die untersuchten Phenole werden mit diesem Sprühreagenz folgendermaßen angefärbt:

2-Hydroxy-biphenyl tiefblau,

3-Hydroxy-biphenyl anfangs türkisblau, später tiefblau,

4-Hydroxy-biphenyl zunächst schwachrosa, nach einiger Zeit farblos,

3,4-Dihydroxy-biphenyl anfangs tiefviolett, bald schwarz,

4,4'-Dihydroxy-biphenyl zunächst blauschwarz, verblaßt schnell in ein schmutziges Grau.

Obwohl 3-Hydroxy-biphenyl und 4-Hydroxy-biphenyl fast den gleichen R_F-Wert haben, kann man dennoch beide Phenole sehr gut unterscheiden, weil nach den Angaben von GIBBS (11) para substituierte Phenole nicht angefärbt werden. Unter der UV-Lampe wird der Fleck,

der diese beiden Phenole anzeigt, umrandet. Sofort nach dem Besprühen mit GIBBS-Reagenz und anschließender Behandlung mit Ammoniakdämpfen färbt sich der markierte Fleck schwachrosa an. Allmählich geht der obere Teil des Flecks in ein türkises Blau, später in ein tiefes Blau über, während der untere, anfangs schwachrosa gefärbte Teil des Flecks rasch verblaßt.

Diese Unterscheidung von 3-Hydroxy-biphenyl und 4-Hydroxy-biphenyl ließ sich in allen untersuchten Proben durchführen.
Beim Entwickeln der Chromatogramme mit Joddampf in der Jodkammer werden 2-Hydroxy-biphenyl, 3-Hydroxy-biphenyl und 4-Hydroxy-biphenyl schwachbraun angefärbt. Dagegen erscheinen 3,4-Dihydroxy-biphenyl violett bis schwarz und 4,4'-Dihydroxy-biphenyl intensiv dunkelbraun.
Von Vorteil ist der letztgenannte Effekt bei der Untersuchung von 3,4-Dihydroxy-biphenyl und 4,4'-Dihydroxy-biphenyl auf mit GIBBS-Reagenz angefärbten Platten: Wenn die zunächst blauschwarze Farbe des 4,4'-Dihydroxy-biphenyl-Flecks verblaßt ist, wird dieser beim Behandeln mit Joddampf erneut intensiv angefärbt.

2. Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen

Mit Hilfe dieser Methodik konnten in jeder untersuchten Probe 3-Hydroxy-biphenyl und 3,4-Dihydroxy-biphenyl gefunden werden. Somit war bewiesen, daß bei allen untersuchten Tierarten, auch bei in-vitro-Versuchen mit Leberhomogenat, neben den schon bekannten Biphenylmetaboliten 2-Hydroxy-biphenyl, 4-Hydroxy-biphenyl und 4,4'-Dihydroxy-biphenyl (3, 4, 9, 22, 25, 26, 33, 37) auch 3-Hydroxy-biphenyl und 3,4-Dihydroxy-biphenyl gebildet werden.

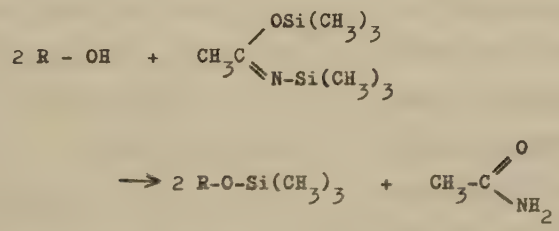
In keiner der Blindproben konnten dünnschichtchromatographisch Biphenylmetaboliten erfaßt werden.

II. Quantitative Erfassung von Biphenylmetaboliten mittels Gaschromatographie

Da die Gaschromatographie es gestattet, alle zu untersuchenden phenolischen Biphenylmetaboliten gleichzeitig auch quantitativ in einer Analyse zu erfassen, lag es nahe, die dünnschichtchromatographisch qualitativ bestimmten Verbindungen auch mit dieser Methode zu identifizieren und vor allem quantitativ zu analysieren.

Ein Verfahren zur gaschromatographischen Messung von Biphenylderivaten im Urin war im hiesigen Institut von Herrn P. Raig (27) ausgearbeitet worden.

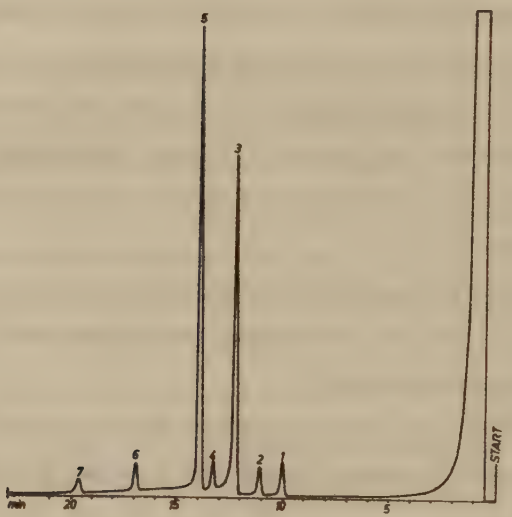
Hierbei werden die zu untersuchenden Phenole mittels Bis-[trimethylsilyl]-acetamid (BSA) (21) nach der allgemeinen Gleichung



in die Trimethylsilyläther übergeführt (21) und als solche gaschromatographisch getrennt.

Es war zu prüfen, ob diese Methode auch auf Messungen mit Proben angewendet werden kann, die aus Leberhomogenat gewonnen waren.

Abbildung Nr. 2: Gaschromatogramm der TMS-Äther der untersuchten Hydroxybiphenyle und der Standardsubstanzen. Stationäre Phase: Silikongummi SE 52. Chromatographiebedingungen siehe experimenteller



1 = Naphthol- (1)

2 = 2-Hydroxy-biphenyl

3 = 4-Methoxy-biphenyl

4 = 3-Hydroxy-biphenyl

5 = 4-Hydroxy-biphenyl

6 = 3,4-Dihydroxy-biphenyl

7 = 4,4'-Dihydroxy-biphenyl

(Die Verbindungen unter 1, 2, 4, 5, 6 und 7 als TMS-Äther)

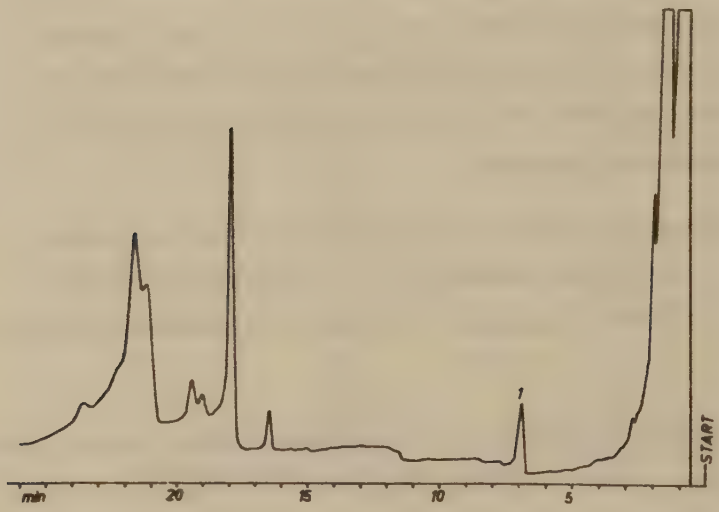
a) Meßmethodik und Schwierigkeiten bei der Analyse

Alle in der Arbeit von RAIG angegebenen Meßbedingungen konnten ohne Einschränkung übernommen werden. Als Standardsubstanzen eigneten sich bei dem vorliegenden Problem wegen ihrer günstigen Retentionszeiten besonders der Trimethylsilyläther von Naphthol-(1) und 4-Methoxy-biphenyl. Bei Verwendung von Säulen, die mit Silikongummi SE 52 gefüllt waren, zeigten die analysierten Phenole und die Standardsubstanzen eine sehr gute Auftrennung. Deshalb war dieses Säulenmaterial für die quantitativen Messungen sehr gut geeignet.

Der Meßfehler bei den Analysen betrug für 2-Hydroxy-biphenyl 4-8 %, für 3-Hydroxy-biphenyl 2-3 %, für 4-Hydroxy-biphenyl 2 %, für 3,4-Dihydroxy-biphenyl 2-3 % und für 4,4'-Dihydroxy-biphenyl 4 %.

3,4-Dihydroxy-biphenyl und 4,4'-Dihydroxy-biphenyl konnten nicht in allen analysierten Proben ausgewertet werden, da bei vielen Messungen andere Substanzen im Bereich ihrer Retentionszeiten lagen. Bei diesen Substanzen könnte es sich um hydroxylierte Derivate des Adenylsäure-Systems handeln, wie z.B. Hydroxynicotinsäure (14). In Frage kämen auch andere schwache organische Säuren oder vielleicht Neutralsubstanzen, die bei der fraktionierten Ausschüttelung miterfaßt wurden. Die letzte Möglichkeit könnte wahrscheinlich sein, da bei vielen Analysenproben auch Biphenyl angezeigt wurde.

Abbildung Nr. 3: Gaschromatogramm der Phenolfraktion eines Kaninchenleberextraktes, als Blindprobe inkubiert, nach Umsetzung mit BSA. Stationäre Phase Silikongummi SE 52. Chromatographiebedingungen siehe experimenteller Teil.



1 = Biphenyl

b) Biphenylhydroxylierung bei Kaninchen

Zur Untersuchung kamen Proben, die aus den mit Biphenyl inkubierten 10 000 x g-Ansätzen des Leberhomogenates von alten und jungen Männchen und Weibchen gewonnen waren.

Biphenylmetaboliten, die in 2-, 4- und auch in 3-, und 3,4-Stellung hydroxyliert waren, konnten eindeutig dünnschicht- und gaschromatographisch identifiziert und unter Einhaltung der von

RAIG P. ausgearbeiteten Meßmethodik quantitativ bestimmt werden. Auch 4,4'-Dihydroxy-biphenyl, welches CREAVEN bei seinen in-vitro-Versuchen als Metabolit des Biphenyls gefunden hatte, wurde nun auch bei 3 Kaninchen quantitativ erfaßt.

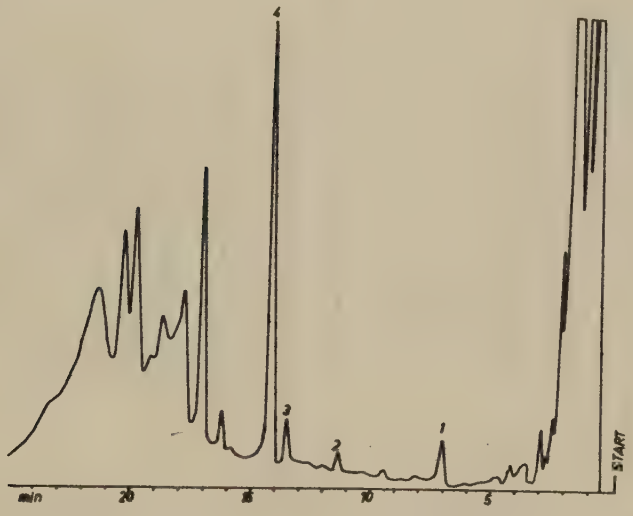
Unterschiede in der Hydroxylierungsrate bei Männchen und Weibchen gleicher Altersgruppen wurden nicht gefunden. Auffallend war das schon von CREAVEN (9) beschriebene verschiedene Verhältnis in der Bildung von 2- und 4-Hydroxy-biphenyl bei jungen Tieren gegenüber dem bei alten. Diese altersabhängige Differenz konnte nun ebenfalls bei der Hydroxylierung des Biphenyls in 3-Stellung beobachtet werden. Bei jungen Tieren fand sich etwa die doppelte Menge an 3-Hydroxy-biphenyl wie bei alten Tieren. Die 3-Hydroxylierung trat gegenüber der 2-Hydroxylierung außer in einem Fall stets in größerem Maße ein. Das Verhältnis von 3-Hydroxy-biphenyl zu 4-Hydroxy-biphenyl betrug bis zu 0,13. 3,4-Dihydroxy-biphenyl wurde etwa in der gleichen molaren Menge wie 3-Hydroxy-biphenyl gefunden.

MITOMA und POSNER (26) fanden bei ihren Untersuchungen mit Kaninchen etwa sechsmal soviel 2- wie 4-Hydroxylierungsprodukt, ein Ergebnis, welches schon von CREAVEN (9) und SINSHEIMER (29) angezweifelt wurde und nun auch hier nicht bestätigt werden konnte. Im Gegensatz zu MITOMA wurde festgestellt, daß Biphenyl bei der enzymatischen Hydroxylierung etwa sechzehnmal mehr in 4-Stellung hydroxyliert wird als in 2-Stellung.

Die von RAIG bei in-vivo-Versuchen gaschromatographisch gefundenen

Biphenylmetaboliten wurden ebenso bei in-vitro-Versuchen quantitativ erfaßt, auch das Verhältnis der Hydroxybiphenyle zueinander war bei den in-vitro-Versuchen das gleiche wie bei den von RAIG durchgeführten in-vivo-Versuchen.

Abbildung Nr. 4: Gaschromatogramm der Phenolfraktion eines Kaninchenleberextraktes nach Umsetzung mit BSA. Stationäre Phase: Silikongummi SE 52. Chromatographiebedingungen siehe experimenteller Teil.



1 = Biphenyl

2 = 2-Hydroxy-biphenyl

3 = 3-Hydroxy-biphenyl

4 = 4-Hydroxy-biphenyl

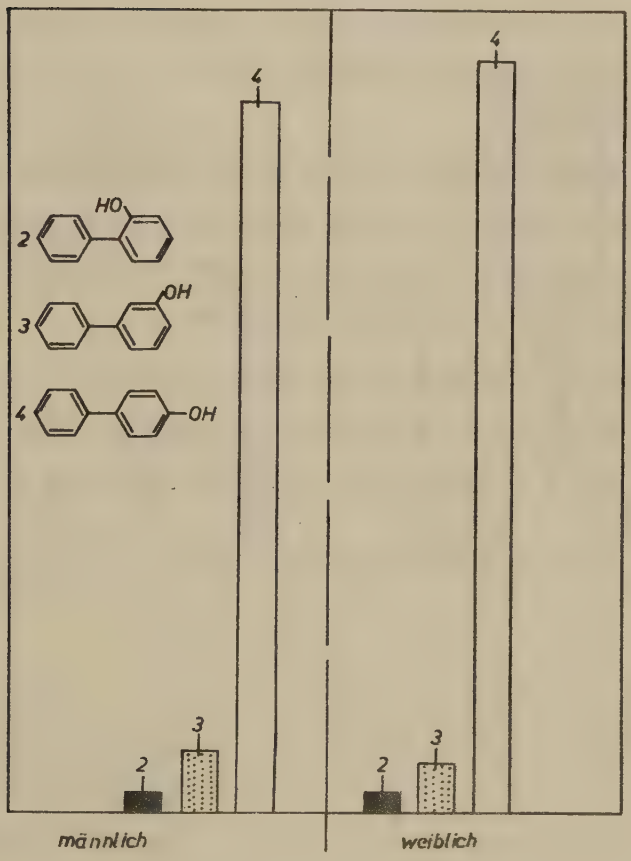
(Die Verbindungen unter 2, 3 und 4 als TMS-Äther)

Abbildung Nr. 5: Biphenylhydroxylierung bei Kaninchen.

Nr.		Alter (Monate)	2-Hydroxy-biphenyl	3-Hydroxy-biphenyl	4-Hydroxy-biphenyl	3,4-Dihydroxy-biphenyl	4,4'-Dihydroxy-biphenyl
1	weiblich	22	0,006	0,008	0,270	0,010	x
2		28	0,006	0,041	0,264	x	0,050
3		36	0,010	0,020	0,420	x	x
4		24	0,007	0,017	0,260	0,011	x
5		28	0,011	0,015	0,280	0,020	x
6	männlich	36	0,006	0,020	0,232	0,011	x
7		36	0,012	0,031	0,330	0,030	x
8		24	0,006	0,016	0,290	0,015	x
9		24	0,016	0,027	0,423	x	x
10		9	0,036	0,053	0,406	0,032	0,070
11		8	0,038	0,051	0,410	0,040	0,059

Ausbeute an Hydroxybiphenylen in /uMol/g frischer Leber bei einer Inkubationsdauer von 45 min.

Abbildung Nr. 6: Biphenylhydroxylierung bei männlichen und weiblichen Kaninchen. Dargestellt ist das Verhältnis von 2- und 3-Hydroxy-biphenyl zu 4-Hydroxy-biphenyl.



c) Biphenylhydroxylierung bei Meerschweinchen

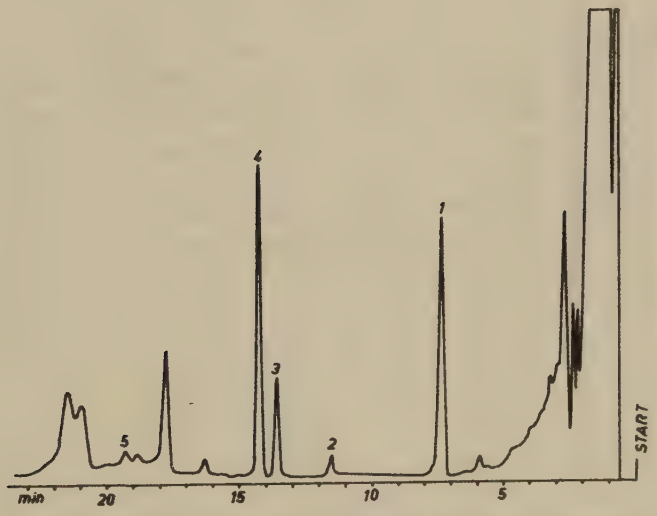
Die mikrosomale Hydroxylierung des Biphenyls zeigte bei Meer-

schweinchen in der mengenmäßigen Entstehung der hydroxylierten Produkte ein anderes Verhältnis als es bei Kaninchen gefunden wurde.
Die 3-Stellung des Biphenyls wird bei ihnen in größerem Maße hydroxyliert als bei den Kaninchen.
4,4'-Dihydroxy-biphenyl wird etwa nur neunmal soviel gebildet wie 3-Hydroxy-biphenyl und ungefähr dreizehnmal soviel wie 2-Hydroxy-biphenyl.

Die 3,4-Hydroxylierung trat in der gleichen Größenordnung wie die 3-Hydroxylierung auf, analog den Verhältnissen bei Kaninchen. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Hydroxylierungsmuster konnten ebenfalls nicht festgestellt werden.

Bei jungen und alten Tieren lagen deutliche Unterschiede vor. Das Verhältnis von 3-Hydroxy-biphenyl zu 4-Hydroxy-biphenyl war bei jungen Meerschweinchen etwa viermal so groß wie bei alten.

Abbildung Nr. 7: Gaschromatogramm der Phenolfraktion eines Meerschweinchenleberextraktes nach Umsetzung mit BSA. Stationäre Phase: Silikongummi SE 52. Chromatographiebedingungen siehe experimenteller Teil.



1 = Biphenyl

2 = 2-Hydroxy-biphenyl

3 = 3-Hydroxy-biphenyl

4 = 4-Hydroxy-biphenyl

5 = 4,4'-Dihydroxy-biphenyl

(Die Verbindungen unter 2, 3, 4 und 5 als TMS-Äther)

Abbildung Nr. 8: Biphenylhydroxylierung bei Meerschweinchen.

Nr.		Gewicht (g)	2-Hydroxy-biphenyl	3-Hydroxy-biphenyl	4-Hydroxy-biphenyl	3,4-Dihydroxy-biphenyl	4,4'-Dihydroxy-biphenyl
12	männlich	520	0,008	0,018	0,290	x	x
13		510	0,023	0,027	0,460	0,026	x
14		210	0,025	0,064	0,213	0,058	x
15		220	0,040	0,053	0,240	0,045	0,063
16		180	0,050	0,042	0,260	x	x
17		190	0,033	0,045	0,216	x	x
18	weiblich	230	0,023	0,032	0,140	x	x
19		210	0,027	0,030	0,145	x	x
20		500	0,019	0,026	0,290	0,045	0,052
21		610	0,017	0,027	0,231	x	x
22		520	0,015	0,021	0,320	0,019	0,042
23		600	0,009	0,019	0,294	0,017	x

Ausbeute an Hydroxybiphenylen in /uMol/g frischer Leber bei einer Inkubationsdauer von 45 min.

Abbildung Nr. 9: Biphenylhydroxylierung bei jungen und alten Meerschweinchen. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von 2- und 3-Hydroxy-biphenyl zu 4-Hydroxy-biphenyl.

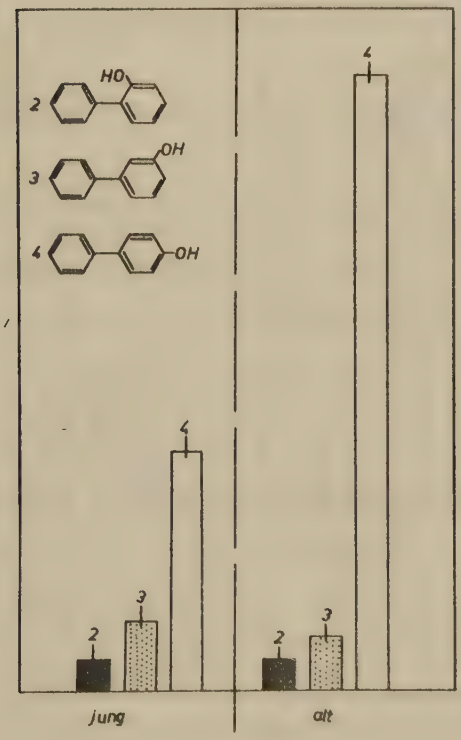
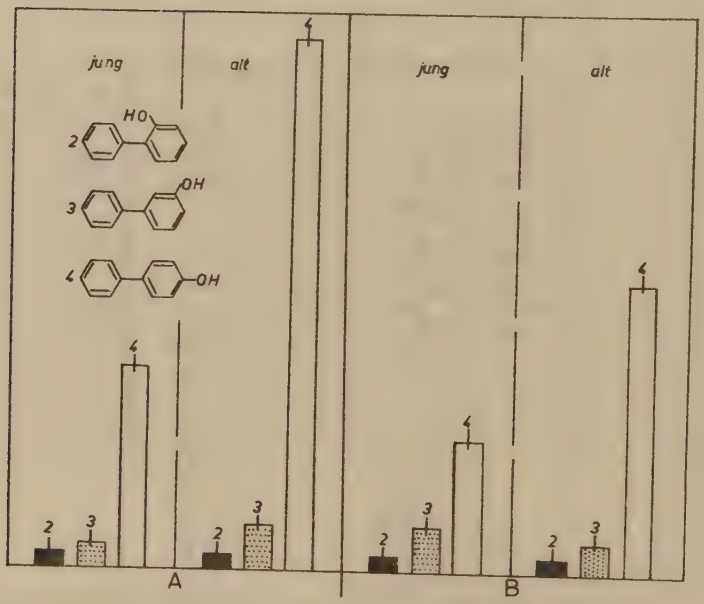


Abbildung Nr. 10: Biphenylhydroxylierung bei jungen und alten Kaninchen und Meerschweinchen. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von 2- und 3-Hydroxy-biphenyl zu 4-Hydroxy-biphenyl.



A = Kaninchen

B = Meerschweinchen

d) Biphenylhydroxylierung bei Ratten

Für die vorliegenden Versuche zur Hydroxylierung des Biphenyls bei Ratten wurden folgende drei nach den Ergebnissen von DRUCKREY (10) als erbrein anzusehende Stämme verwendet:

Stamm I: BD IV, Phänotyp: Tiere mit schwarzer Haubenscheckung und roten Augen,
Genotyp: CPah,
Stamm II: BD IX, Phänotyp: Wildfarbene Tiere mit dunklen Augen ohne Haubenscheckung,
Genotyp: CPAH,
Stamm III: R, Phänotyp: Albino mit hellroten Augen,
Genotyp: cPAh.

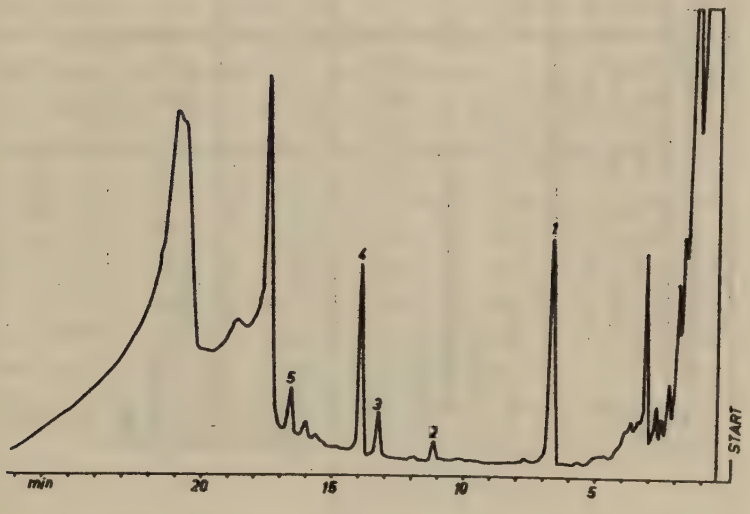
Der Genotyp der Stämme I und III wurde von HILLERT aufgeklärt (17).
Vom letzten Stamm standen alte und junge Tiere zur Verfügung.

Alle Biphenylmetaboliten, die auch bei Kaninchen und Meerschweinchen auftraten, konnten bei jedem Stamm identifiziert werden. 4,4'-Dihydroxy-biphenyl wurde nur qualitativ erfaßt, da in jeder der Proben die schon erwähnten störenden Substanzen eine quantitative Auswertung verhinderten.
Zwischen den einzelnen Tieren der gleichen erbreinen Stämme zeigten sich keine Unterschiede im Hydroxylierungsmuster. Erwähnenswert sind jedoch deutliche Abweichungen zwischen den einzelnen Stämmen. So wurde z.B. im Inkubationsansatz von Stamm I Biphenyl etwa zehnmal mehr in 4-Stellung als in 3-Stellung hydroxyliert. Bei Stamm II trat dementgegen 4-Hydroxy-biphenyl nur dreimal mehr als 3-Hydroxy-biphenyl auf. Bei Stamm I konnte doppelt soviel 3-4-Dihydroxy-biphenyl gefunden werden wie bei Stamm II. Stamm III bildete 2-Hydroxy-biphenyl in sehr viel geringerer Menge als die beiden anderen Stämme, obwohl altersmäßig kein Unterschied zwischen ihnen bestand. Bei einem Tier wurde eine 2-Hydroxylierung des

Biphenyls überhaupt nicht gefunden. Eine altersabhängige unterschiedliche Hydroxylierung in 2-, 3- und 4-Stellung ließ sich bei diesem Stamm deutlich nachweisen.

Das Hydroxylierungsmuster bei Ratten unterscheidet sich sowohl von dem der Kaninchen als auch von dem der Meerschweinchen. Es ähnelt aber mehr dem der letzten Tierart.

Abbildung Nr. 11: Gaschromatogramm der Phenolfraktion eines Rattenleberextraktes nach Umsetzung mit BSA. Stationäre Phase: Silikongummi SE 52. Chromatographiebedingungen siehe experimenteller Teil.



1 = Biphenyl

2 = 2-Hydroxy-biphenyl

3 = 3-Hydroxy-biphenyl

4 = 4-Hydroxy-biphenyl

5 = 3,4-Dihydroxy-biphenyl

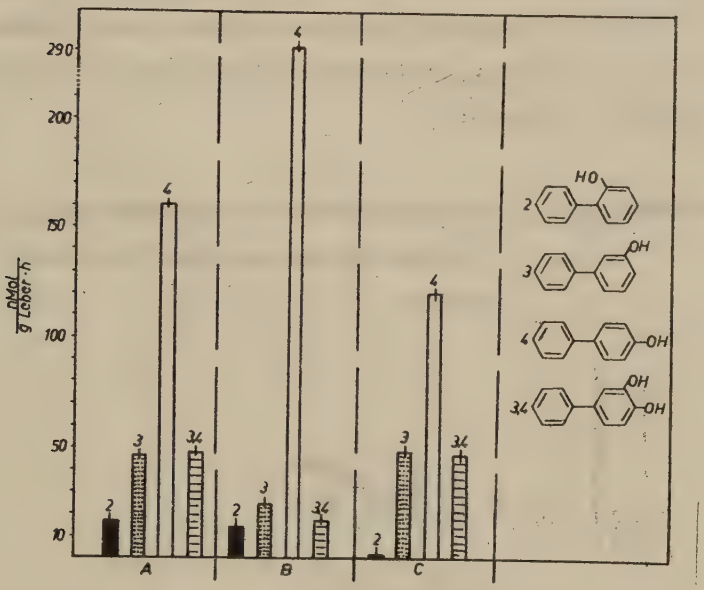
(Die Verbindungen unter 2, 3, 4 und 5 als TMS-Äther)

Abbildung Nr. 12: Biphenylhydroxylierung bei Ratten.

Nr.		Gewicht (g)	Rasse	2-Hydroxy-biphenyl	3-Hydroxy-biphenyl	4-Hydroxy-biphenyl	3,4-Dihydroxy-biphenyl	4,4'-Dihydroxy-biphenyl
24	männlich	420	Hausmeerschweinchen	0,019	0,044	0,154	0,043	x
25		440		0,018	0,043	0,153	0,045	x
26		470		0,018	0,058	0,176	0,058	x
27		380	wildfarbene Ratten	-	0,027	0,310	0,023	x
28		400		0,018	0,022	0,290	0,020	x
29		430		0,018	0,036	0,280	0,027	x
30	weiblich	370	Millibrunk Ratten	-	0,053	0,094	0,055	x
31		290		0,002	0,050	0,146	0,049	x
32		320		0,002	0,042	0,116	0,037	x
33		110		0,039	0,076	0,291	0,068	x
34		93		0,035	0,068	0,270	0,066	x
35		85		0,037	0,054	0,262	0,070	x

Ausbeute an Hydroxybiphenylen in /uMol/g frischer Leber bei einer Inkubationsdauer von 45 min.

Abbildung Nr. 13: Biphenylhydroxylierung bei drei verschiedenen Rattenarten.



A = Haubenratten

B = wildfarbene Ratten

C = Mühlbock Ratten

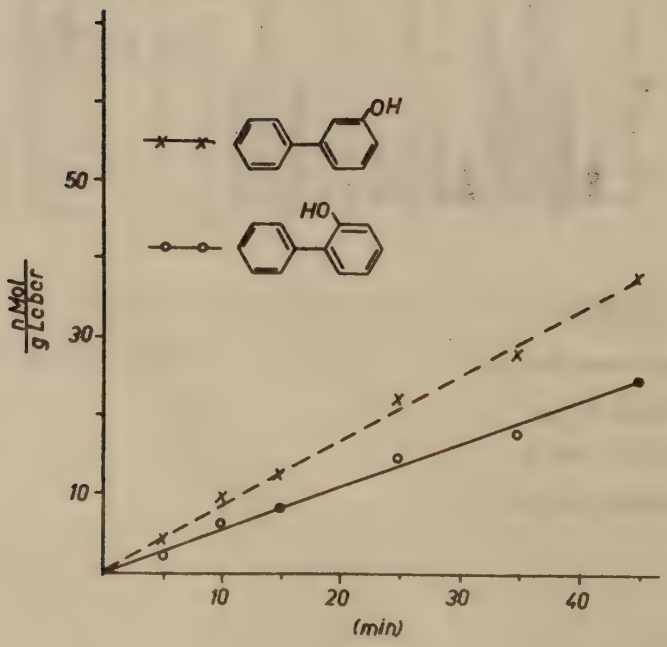
Gewicht: 290 - 440 g

Inkubationszeit 45 min.

e) Mikrosomale Hydroxylierung des Biphenyls in Abhängigkeit von der Zeit

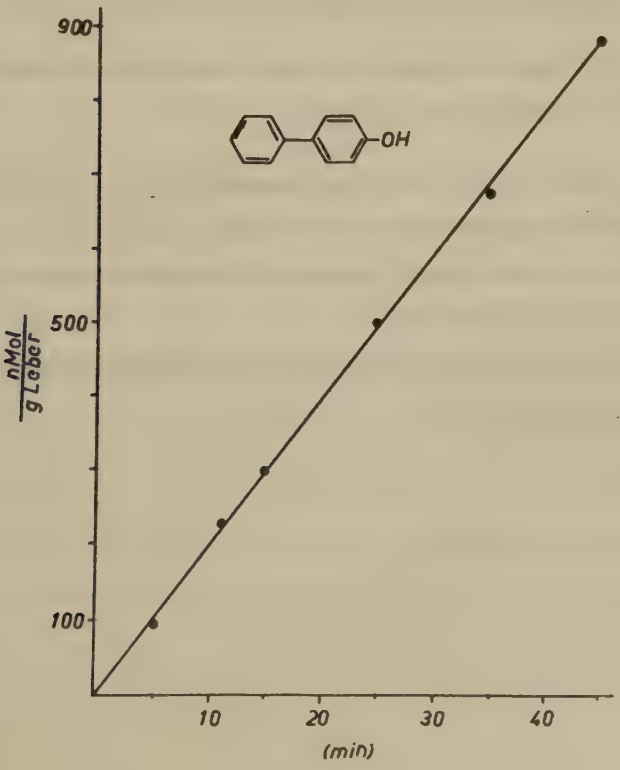
Zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion wurden die Lebern von zwei Jahren alten männlichen Schwarzloh-Kaninchen verarbeitet. Die quantitative Bestimmung der Biphenylmetaboliten in ortho-, meta- und para-Stellung wurde gaschromatographisch, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

Abbildung Nr. 14: Biphenylhydroxylierung in Abhängigkeit von der Zeit. Bildung von 2- und 3-Hydroxybiphenyl.



Wie zu erwarten war, stieg die para-Hydroxylierung in Abhängigkeit von der Zeit am stärksten an. In einem großen Abstand folgten die meta- und anschließend die ortho-Hydroxylierung. Nach 45 min Inkubationsdauer konnte noch kein Abfall der Hydroxylierungsaktivität festgestellt werden. Das Verhältnis der Isomeren zueinander blieb unabhängig von der Zeit gleich.

Abbildung Nr. 15: Biphenylhydroxylierung in Abhängigkeit von der Zeit. Bildung von 4-Hydroxybiphenyl.



Zusammenfassung

Die enzymatische Hydroxylierung von Biphenyl wurde in Lebermikrosomen von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten untersucht.
Die hydroxylierten Biphenyle wurden dünnschichtchromatographisch und gaschromatographisch erfaßt.
Mit Hilfe der Gaschromatographie ließen sich alle Hydroxybiphenyle gleichzeitig quantitativ bestimmen.

Hierbei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Neben den schon bekannten in ortho- und para-Stellung hydroxylierten Biphenylderivaten wurden 3-Hydroxy-biphenyl, 3,4-Dihydroxy-biphenyl und 4,4'-Dihydroxy-biphenyl nachgewiesen.

2. Biphenyl wurde in größerem Ausmaß in der meta-Stellung hydroxyliert als in der ortho-Stellung.

3. Das Verhältnis der einzelnen Biphenylmetaboliten zueinander war bei verschiedenen Tierarten unterschiedlich.
   Innerhalb einer Tierart zeigten sich wiederum Unterschiede bei alten und jungen Tieren.
   Bei Ratten wurde festgestellt, daß das Hydroxylierungsmuster rassenabhängig ist.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die mikrosomale Hydroxylierung des Biphenyls untersucht werden, besonders im Hinblick auf die 3-Hydroxylierung.

Zur quantitativen Erfassung der Hydroxybiphenyle sollte ein geeignetes analytisches Verfahren angewendet werden. Hierzu war in der Literatur als einziges Verfahren eine von BRIDGES und CREAVEN beschriebene fluorometrische Methode zu finden (5, 9). Mit diesem Meßverfahren lassen sich jedoch lediglich zwei Verbindungen gleichzeitig erfassen. Außerdem können gewisse Störfaktoren die Analyse beeinflussen. So dürfte z.B. durch das Vorhandensein von 3-Hydroxy-biphenyl in den Analysenproben eine Messung von 2- und 4-Hydroxy-biphenyl, wie sie CREAVEN durchführte (9), verfälscht werden.

Die Gaschromatographie zeigt im Vergleich mit der fluorometrischen Messung trotz einer meist zeitraubenden Probenvorbereitung erhebliche Vorteile. Es können z.B. mit einer von RAIG (27) ausgearbeiteten Meßmethode zur gaschromatographischen Erfassung von Hydroxybiphenylen aus Urinextrakten alle diese Verbindungen in einem Chromatogramm unabhängig voneinander quantitativ ausgewertet werden. Nach einer entsprechenden Probenvorbehandlung war es nun möglich, dieses Verfahren auch auf Messungen auszudehnen, bei denen das Probenmaterial aus Leberhomogenatextrakten gewonnen war. Es gelang jedoch nicht bei allen Analysen 3,4- und 4,4'-Dihydroxy-biphenyl in den Chromatogrammen auszuwerten. Die Gründe hierzu wurden im Hauptteil beschrieben.

Bei in-vivo-Versuchen mit Kaninchen, Ratten und Mäusen fand RAIG als neues Stoffwechselprodukt des Biphenyls ein in der 3-Stellung hydroxyliertes Biphenyl (28). Diese Verbindung entstand ebenfalls bei den in dieser Arbeit durchgeführten in-vitro-Hydroxylierungen. Bei den hier untersuchten Tieren wurde, außer in einem Fall, die 3-Stellung in größerem Maße hydroxyliert als die 2-Stellung. Sowohl bei den in-vivo- als auch bei den in-vitro-Versuchen war das Verhältnis der mengenmäßigen Bildung von 3-Hydroxy-biphenyl bei den zu vergleichenden Tieren ungefähr das gleiche. Es kann somit ausgeschlossen werden, daß das Auftreten dieser Verbindung im Urin nach Verfütterung von Biphenyl etwa durch Darmbakterien hervorgerufen werden könnte. Faßt man die mikrosomalen Hydroxylierungen von aromatischen Verbindungen als elektrophile Substitutionen auf (35), so ist die verhältnismäßig große Menge an gebildetem 3-Hydroxy-biphenyl als ungewöhnlich anzusehen. Sie läßt sich jedoch zu einem gewissen Teil durch den kürzlich entdeckten "NIH-shift" (34, 13) erklären.

Erstmalig konnten bei diesen in-vitro-Versuchen neben dem schon erwähnten 3-Hydroxy-biphenyl auch 3,4- und 4,4'-Dihydroxy-biphenyl quantitativ erfaßt werden. Obwohl diese Verbindungen in relativ großer Menge entstehen, wurden sie bisher nur bei in-vivo-Versuchen beschrieben (28, 37, 9).
4,4'-Dihydroxy-biphenyl ist vermutlich ein Folgeprodukt von 4-Hydroxy-biphenyl (37), welches als Hauptstoffwechselprodukt der Biphenylhydroxylierung anzusehen ist (37, 38). Letztes konnte auch hier bestätigt werden. Eindeutig kann den Angaben von MITOMA

und POSNER (26) widersprochen werden, die bei in-vivo-Versuchen mit Kaninchenlebermikrosomen etwa sechsmal mehr 2- als 4-Hydroxy-biphenyl fanden. Hierbei dürfte es sich wahrscheinlich um einen Meßfehler handeln.

Das Auftreten geringer Mengen von 2-Hydroxy-biphenyl kann damit erklärt werden, daß die 2-Stellung einer sterischen Hinderung bei der Hydroxylierung unterworfen sein könnte.

Über die an der Biphenylhydroxylierung in 2- und 4-Stellung beteiligten Enzymsysteme liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: Einerseits scheint es sich auf Grund der Untersuchungen von CREAVEN et al. (7) um zwei verschiedene Enzyme zu handeln, andererseits deuten neuere Ergebnisse von JAFFE et al. (18) auf eine Isoenzymtransformation ein und desselben Enzymkomplexes hin.

Inwieweit die hier beschriebene 3-Hydroxylierung des Biphenyls mit diesen Ergebnissen in Einklang zu bringen ist, oder welche Rolle der "NIH-shift" hierbei spielt, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Experimenteller Teil

I. Substanzen

Biphenyl:	EGA Chemie KG Keppler & Reif
2-Hydroxy-biphenyl:	Gesellschaft für Teerverwertung mbH, Duisburg-Meiderich,
4,4'-Dihydroxy-biphenyl, 4-Hydroxy-biphenyl:	Fluka AG chem. Fabrik Buchs, Schweiz,
3-Hydroxy-biphenyl, 3,4-Dihydroxy-biphenyl, 4-Methoxy-biphenyl:	Diese Substanzen wurden mir von Herrn Dr. Raig freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
NADP:	Boehringer & S., Mannheim,
Naphthol-(1), Nicotinsäureamid, 2,6-Dichlor-chinon-chlorimid:	E. Merck AG, Darmstadt
Cremophor EL:	BASF, Ludwigshafen/Rhein

II. Tiermaterial

1. Schwarzloh-Kaninchen beiderlei Geschlechts, davon Tiere verschiedener Altersgruppen.

2. Bunte Meerschweinchen beiderlei Geschlechts, davon Tiere verschiedener Altersgruppen.

3. Ratten beiderlei Geschlechts, verschiedener Altersgruppen von drei verschiedenen Stämmen.
(Genaue Bezeichnung der Stämme Seite 27)

Die unter 1. und 3. aufgeführten Tiere stammen aus der Tierhaltung der Abteilung für biochemische Tumorforschung des hiesigen Physiologisch-Chemischen Institutes, während die unter 2. genannten Tiere mir freundlicherweise aus der Zucht des hiesigen Hygiene-Institutes überlassen wurden.

III. Leberhomogenatherstellung und Inkubationsbedingungen

Die Tiere wurden über Nacht entfüttert, am nächsten Morgen mit Äther narkotisiert, getötet und die Leber schnell entnommen. Die folgenden Arbeitsgänge erfolgten bei einer Temperatur von etwa 0°.
Die Leber wurde mit einer Schere fein zerkleinert und die Stückchen mit Filtrierpapier getrocknet. Danach wurde pro g Leber 5 mg (41 µMol) Nicotinamid und das dreifache Volumen einer eiskalten 1,15 proz. KCl-Lösung zugefügt und die Mischung

etwa 1 min in einem Pistillhomogenisator nach POTTER und ELVEHJEM (Firma Braun, Melsungen) mit einem Teflonstempel unter Außenkühlung mit Eis/Kochsalz homogenisiert. Das Homogenat wurde nun mit eiskalter KCl-Lösung so aufgefüllt, daß zu 1 g Leber 4 ml KCl kamen. Diese Mischung wurde nach der Standardmethode von MITOMA und Mitarbeitern (26) bei 10 000 x g 10 min in einer Christ-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der 10 000 x g-Überstand wurde vorsichtig von dem Sediment getrennt, die Fettschicht über Glaswolle abfiltriert und in zwei gleiche Volumina geteilt.

Teil I wurde bei 38° unter kräftigem Rühren mit einem Magnetrührer und Aufblasen von Sauerstoff nach Zusatz folgender Substanzen 45 min inkubiert:

Alle Angaben sind auf 1 ml Homogenat (= 250 mg Leber) bezogen.

0,197 mg (0,25 µMol) NADP,

1 ml Biphenyllösung (0,925 g (6 µMol) Biphenyl),

1 ml 0,05-M-tris-HCl Puffer, pH 8,6.

Teil II wurde 5 min gekocht und anschließend unter denselben Bedingungen und Zusätzen als Blindprobe inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von konz. HCl gestoppt (etwa 1/10 der Menge des 10 000 x g-Überstandes).

Herstellung der Biphenyllösung:

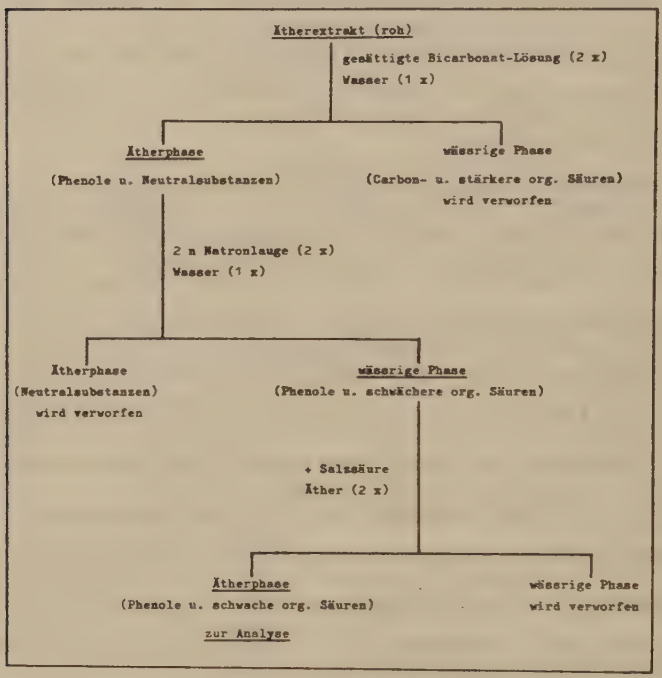
185 mg Biphenyl wurden in 2 g Cremophor El unter Rühren bei 60° aufgelöst und mit einer 1,15 proz. KCl-Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Beim Stehenlassen der Lösung bei Raumtemperatur fallen nach ungefähr 2 Std Biphenylkristalle aus, die beim Erwärmen auf 60° wieder in Lösung gehen. Die Lösung ist bei 38° stabil!

IV. Aufarbeitung der Inkubationsmischungen

Die Inkubationsmischungen wurden nach dem Zusatz von HCl in einer Extraktionsapparatur nach KUTSCHER und STEUDEL (23) ca. 48 Std kontinuierlich unter Rühren mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde zur Gewinnung der Phenole nach folgendem Schema aufgearbeitet:

Zunächst wurde zweimal mit gesättigter Na_2CO_3-Lösung ausgeschüttelt und mit destilliertem Wasser nachgewaschen, anschließend wurde der Vorgang mit 2 n NaOH wiederholt und etwa 12 Std bis zur vollständigen Abtrennung der Ätherphase stehen gelassen. Die wässrige Phase wurde mit 2 n HCl angesäuert und diese nochmals mit Äther extrahiert. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Ätherphase über Na_2SO_4. Nun wurde im Rotationsverdampfer bei ca. 30° Wasserbadtemperatur der Äther abgezogen und ein kleiner Teil des Rückstandes für die Dünnschichtchromatographie entnommen. Der verbleibende größere Teil wurde über $CaCl_2$ und Paraffinspänen im Vakuumexsikator 24 Std getrocknet und für die Gaschromatographie aufbewahrt.

Abbildung Nr. 16: Fraktioniertes Ausschütteln des Ätherextraktes zur Gewinnung der Phenolfraktion.



V. Dünnschichtchromatographie

Die Platten wurden nach der Standardvorschrift von STAHL (32) hergestellt.

Zum Auftragen des Kieselgels auf die Glasplatten (Format 20 x 20 bzw. 5 x 20) wurde ein Streichgerät der Firma DESAGA, Heidelberg, benutzt, nachdem zuvor eine Schichtdicke von 0,25 mm eingestellt worden war. Die Platten wurden etwa 30 min an der Luft stehen

gelassen und anschließend im Trockenschrank 1 Std bei 100° aktiviert. Als Sorptionsmittel diente Kieselgel P/UV_{254} der Firma MACHERY-NAGEL & CO., Düren. Zur qualitativen Untersuchung wurden 3-5 mg des getrockneten Extraktionsrückstandes in 0,5 ml Methanol gelöst und 10 µl dieser Lösung auf den Startpunkt aufgetragen. Die Lösungen der Vergleichssubstanzen waren 1 proz. in Methanol und wurden in gleicher Weise aufgetragen.

Die dünnschichtchromatographische Identifizierung der untersuchten Biphenylmetaboliten erfolgte in verschiedenen Fließmittelsystemen:

Benzol, Methanol, Ameisensäure (90:9:1),

Dichlormethan, Methanol, konz. Ammoniaklösung (94:5:1),

1,2-Dichlor-äthan, Aceton (95:5),

Petroläther, Chloroform, Methanol (50:45:5),

Benzol, Isopropylalkohol, konz. Ammoniaklösung (70:25:5)

Benzol, Isopropylalkohol, konz. Ammoniaklösung (90:9:1).

In Abbildung Nr. 17 sind die R_F-Werte der einzelnen Verbindungen aufgeführt. Die Laufstrecke betrug 10 cm.

Abbildung Nr. 17: R_F-Werte der untersuchten Hydroxybiphenyle in verschiedenen Fließmittelsystemen.

	R_F 1	R_F 2	R_F 3	R_F 4	R_F 5	R_F 6
2-Hydroxy-biphenyl	0,68	0,68	0,77	0,67	0,82	0,74
3-Hydroxy-biphenyl	0,54	0,38	0,63	0,46	0,79	0,62
4-Hydroxy-biphenyl	0,53	0,36	0,62	0,45	0,77	0,59
3,4-Dihydroxy-biphenyl	0,32	-	0,35 +	0,12	0,65 +	0,34 +
4,4'-Dihydroxy-biphenyl	0,30	-	0,32 +	-	0,62	0,30

1 = Benzol, Methanol, Ameisensäure (90:9:1)

2 = Dichlormethan, Methanol, konz. Ammoniaklösung (94:5:1)

3 = 1,2-Dichlor-äthan, Aceton (95:5)

4 = Petroläther, Chloroform, Methanol (50:45:5)

5 = Benzol, Isopropylalkohol, konz. Ammoniaklösung (70:25:5)

6 = Benzol, Isopropylalkohol, konz. Ammoniaklösung (90: 9:1)

- = Substanz bleibt am Start

+ = Schwanzbildung, R_F-Wert ist nur annäherungsweise zu bestimmen

Zur Sichtbarmachung der Phenole wurden die lufttrockenen Platten zunächst im UV-Licht bei 254 m/u betrachtet, dann mit GIBBS-Reagenz (11) besprüht und anschließend mit Joddampf behandelt.

Zur Herstellung des GIBBS-Reagenzes wurde 1 g 2,6-Dichlorchinon-chlorimid in 100 cm^3 Äthanol gelöst. Nach dem Besprühen der Platten mit dieser Lösung wurde das Chromatogramm zur Entwicklung mit Ammoniakdämpfen behandelt.

VI. Präparative Schichtchromatographie

70 g Kieselgel (P/UV_{254}, MACHERY, NAGEL & CO., Düren) wurden mit 120 ml destilliertem Wasser 1 min innig verrührt. Bei einer Schichtdicke von 1,5 mm reichte diese Mischung für 2 Platten vom Format 20 x 20 cm. Nach dem Beschichten wurden die Platten etwa 30 min an der Luft stehen gelassen und anschließend bei 100° 1 Std aktiviert.

20-80 mg des getrockneten Extraktionsrückstandes wurden in 0,5 ml Methanol gelöst und mit einer Pipette bandförmig auf die gesamte Startlinie aufgetragen.

Fließmittel war Benzol, Methanol, Ameisensäure (90:9:1).

Die Laufstrecke betrug 20 cm.

Nach dem Abdampfen des Fließmittels wurde das Chromatogramm im UV-Licht bei 254 m/u betrachtet und die Substanzstreifen markiert. Die substanzenthaltenden Zonen wurden abgeschabt und mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, der Äther abgezogen und der Rückstand

im Vakuumexsikator über $CaCl_2$ und Paraffinspänen 24 Std getrocknet.

VII. Gaschromatographie

Die Gaschromatogramme wurden mit dem Fraktometer F7-HF der Firma Perkin-Elmer gemessen.

Es wurde mit in Kompensation geschalteten Säulenpaaren unter Verwendung der Flammenionisationsdetektoren (FIDs) gearbeitet. Die Wasserstoffströmung für die FIDs betrug 35 ml/min, die Luftströmung etwa 250 ml/min.

Zur Identifizierung der Phenole wurden folgende Säulentypen benutzt:

1. Säulentyp 42 S 5.16 der Firma Perkin-Elmer, 2 m lange U-förmige Stahlsäulen mit einem inneren Durchmesser von 3 mm, gefüllt mit 5 % Silikongummi SE 52 auf Kieselgur, 60-100 mesh.

2. Säulentyp 42 S 55.56 der Firma Perkin-Elmer mit den selben Abmessungen wie unter 1., gefüllt mit 4 % Nitrilsilikonöl XE 60 auf Chromosorb G, 80-100 mesh.

Für die quantitativen Bestimmungen der Biphenylmetaboliten wurde der erstgenannte Säulentyp verwendet.

Als Trägergas wurde nachgereinigter Stickstoff (35 ml/min) benutzt. Bei den Analysen wurden folgende Arbeitstemperaturen eingehalten (27):

Säulentemperatur: 5 min isotherm 150°, anschließend linearer Temperaturanstieg mit 7,5°/min bis 230°,

Einspritzblocktemperatur: 270°,

Temperatur der Leitungen: 270°.

Es wurde ein Verdampfungsrohr aus Glas verwendet.
Bis-[trimethylsilyl]-acetamid (BSA) wurde nach der Vorschrift von KLEBE et al. (21) von Herrn Dr. P. Raig dargestellt und mir freundlicherweise überlassen.

a) Silylierungen mit BSA

1. Eichlösungen

30-60 mg Phenolgemisch und 35 mg 4-Methoxy-biphenyl (Vergleichs- und Standardsubstanzen) wurden in einer kleinen Menge Chloroform aufgenommen und die 50-fache molare Menge an BSA dazugegeben.
Diese Mischung wurde 30 min auf 60° erwärmt. Die abgekühlte Lösung wurde mit Chloroform auf 10 ml aufgefüllt. Zur gaschromatographischen Trennung wurden 1 µl der Lösung mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze dosiert.

2. Silylierung der Phenolfraktionen

20-80 mg der Phenolfraktion wurde in 10-ml-Sovirel-Druckreagenzgläsern mit Schraubverschlüssen und Teflondichtungen mit 0,2 ml Chloroform und 0,2 ml BSA versetzt und die Silylierung, wie oben, durchgeführt. Zur gaschromatographischen Trennung wurden 1-2 µl Lösung eingespritzt.

b) Einwaage der Standardsubstanzen

Als Standardsubstanzen wurden Naphthol-(1) und 4-Methoxy-biphenyl verwendet.
Retentionszeiten siehe Abbildung Nr. 18.

Abbildung Nr. 18: Die Retentionszeiten sind vom Start an gemessen und beziehen sich auf die auf Seite 46 genannten Arbeitsbedingungen.

Trimethylsilyl-Äther	Retentionszeiten (min)	
	Stationäre Phase SE 52	Stationäre Phase XE 60
Naphthol-(1)	10,0	10,8
2-Hydroxy-biphenyl	11,3	10,5
3-Hydroxy-biphenyl	13,5	13,8
4-Hydroxy-biphenyl	14,1	14,2
3,3-Dihydroxy-biphenyl	17,0	16,3
4,4'-Dihydroxy-biphenyl	19,7	19,0
4-Methoxy-biphenyl	12,3	14,4

80,00 mg Naphthol-(1) wurden in einem 10 ml Meßkolben in 0,5 ml Chloroform gelöst, mit 0,5 ml BSA versetzt und nach der Silylierung auf 10 ml mit Chloroform aufgefüllt. 1 µl der Lösung enthält 0,008 mg Naphthol-(1).

600,00 mg 4-Methoxy-biphenyl wurden in einen 5 ml Meßkolben eingewogen und mit Chloroform auf 5 ml aufgefüllt. 1 µl Lösung enthält 0,120 mg 4-Methoxy-biphenyl.

Zu den silylierten Proben wurden 1-10 µl dieser Lösungen mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze zugegeben.

c) Umwandlung der GC-Meßwerte in das Analysenergebnis

Die Berechnung der Korrekturfaktoren und die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgten nach Angaben von KAISER (20).

1. Berechnung der Korrekturfaktoren:

$$f_i \text{ Phenol} = \frac{\text{Gramm}_i \cdot \text{Peakfläche Standardsubstanz}}{\text{Gramm}_{\text{Standardsubstanz}} \cdot \text{Peakfläche}_i}$$

2. Berechnung der Biphenylmetaboliten in der Probe:

(mit innerem Standard)

$$\text{Stoff}_i \text{ (}/\text{uMol)} = W_i \cdot f_{Sti} \cdot \frac{Z_{St}}{Mg_i \cdot W_{St} \cdot 1000}$$

Z_{St} = Zuwaage Standardsubstanz in Gramm

W_i = Peakfläche Phenol

W_{St} = Peakfläche innerer Standard

Peakfläche = Höhe mal Breite in halber Höhe

f_{Sti} = Standardkorrekturfaktor

Mg_i = Molekulargewicht der Substanz i

3. Berechnung der Näherungsstandardabweichung s (20):

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{N - M}}$$

x_{ij} = Meßwerte der Peaks

$\bar{x}_j$ = Mittelwerte der Meßwerte der Peaks

N = Zahl aller Meßwerte

M = Zahl der ausgewerteten Peaks in einer Probe

Literaturverzeichnis

1. AMMON, R.: Zur Frage der Toxikologie des Diphenyls und des Orthophenylphenols. Ernährungswirtschaft 7, (1966): 450

2. BACHMANN, E., GOLDBERG, L. and DI GIACOMO, P.: Aspects of the determination of biphenyl hydroxylase activity in liver homogenates. Experim. Mol. Pathology 12, (1970): 212

3. BERNINGER, H., AMMON, R., BERNINGER, I.: Spektralphotometrische Identifizierungen von Hydroxylderivaten des Biphenyls. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, (1968): 880

4. BLOCK, W.D. und CORNISH, H.H.: Metabolism of biphenyl and 4-chlorobiphenyl in the rabbit. J. biol. Chem. 234, (1959): 3301

5. BRIDGES, J.W., CREAVEN, P.J. and WILLIAMS, R.T.: The fluorescence of some biphenyl derivates. Biochem. J. 96, (1965): 872

6. CHILDS, J.F.L. and SIEGLER, E.A.: Compounds for control of orange decays. Science 102, (1945): 68

7. CREAVEN, P.J. and PARKE, D.V.: The stimulation of hydroxylation by carcinogenic and noncarcinogenic compounds. Biochem. Pharmac. 15, (1965): 7

8. CREAVEN, P.J., PARKE, D.V. and WILLIAMS, R.T.: A spektrofluorimetric study of the 7-hydroxylation of cumarin by liver mikrosomes. Biochem. J. 96, (1965): 390

9. CREAVEN, P.J., PARKE, D.V. and WILLIAMS, R.T.: Fluorimetric study of the hydroxylation of biphenyl in vitro by liver preparations of various species. Biochem. J. 96, (1965): 879

10. DRUCKREY, H., DANNEBERG, P., DISCHLER, W. und STEINHOFF, D.: Reinzucht von 10 Rattenstämmen (BD-Stämme) und Analyse des genetischen Pigmentierungs-Systems. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 12, (1962): 911

11. GIBBS, H.D.: Phenol tests III. The indophenol test J. biol. Chem. 73, (1927): 649

12. GILLETTE, J.R., CONNEY, A.H. et al: Oxidases and related redox systems. Academic Press New York, London (1969)

13. GUROFF, G., DALY, J., JERINA, D., RENSON, J., UDENFRIEND, S. and WITKOP, B.: Hydroxylation-inducet migration: The NIH-shift. Science 157, (1967): 1524

14. HAINES, M.E., JOHNSTON, I.R., MATHIAS, A.P. and RIDGE, D.: The synthesis of nicotinamide-adenin dinucleotide and poly (adenosin diphosphat ribose) in various classes of rat liver nuclei. Biochem. J. 115, (1969): 881

15. HAYAISHI, O.: Biological oxidations in Annual review of Biochemistry 31, (1962): 25

16. HAYAISHI, O.: Enzymic hydroxylation in Annual review of Biochemistry 38, (1969): 21

17. HILLERT, E.: Dissertation Univ. Saarbrücken (1969)

18. JAFFE, H., FUJÜ, K., GUERIN, H., SENGUPTA, M. and EPSTEIN, S.S.: Hydroxylations by mouse liver microsomes. Biochem. Pharmac. 18, (1969): 1045

19. JORDAN, T.W.: Oxidation inhibitors in homogenates of houseflies and blowflies. Int. J. Biochem. 1(2), (1970): 139

20. KAISER, R.: Chromatographie in der Gasphase. Band 4, Bibliographisches Institut AG, Mannheim (1965)

21. KLEBE, J.F., FINKBEINER, H. and WITHE, D.M.: Silylations with bis-[trimethylsilyl]-acetamide, a highly reactive silyl donor. J. Amer. chem. soc. 88, (1966): 3390

22. KLINGENBERG, K.: Studien über die Oxydationen aromatischer Substanzen im tierischen Organismus. Jber. Fortschr. Tierchem. 21, (1891): 57

23. KUTSCHER, F. und STEUDEL, H.: Beschreibung eines Ätherextraktionsapparates. Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiolog. Chem. 39, (1903): 474

24. MASON, H.S. and MORRISON: Oxidases an related redox systems. J. Wiley, New York (1965)

25. MILLBURN, P., SMITH, R.L. and WILLIAMS, R.T.: Biliary excretion of foreign compounds. Biochem. J. 105, (1967): 1275

26. MITOMA, C., POSNER, H.S., REITZ, H.C. and UDENFRIEND, S.: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds.

27. RAIG, P. und AMMON, R.: Gaschromatographische Analyse der phenolischen Stoffwechselprodukte des Biphenyls Arzneim.-Forsch. (Drug res.) 20, (1970): 1266

28. RAIG, P.: Noch unveröffentlicht

29. SINSHEIMER, J.E. und SMITH, R.V.: Metabolic hydroxylations of trans-stilbene Biochem. J. 111, (1969): 35

30. SOUCI, S.W., REHM, H.J., LUFER-HEYDENREICH, S. und HERBIG, G.: Zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung von Biphenyl und Derivaten des Biphenyls Z. Lebensmitt.-Untersuch. 134, (1967): 209

31. SPERRLICH, H.: Zum Nachweis von Biphenyl und Orthophenylphenol in Citrusfrüchten. Z. Lebensmitt.-Untersuch. 123, (1963): 269

32. STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 2. Auflage (1967)

33. STROUD, S.W.: The metabolism of parent compounds of some of the simpler synthetic oestrogenic hydrocarbons. J. Endocrinology 2, (1940): 55

34. UDENFRIEND, S., ZALTZMAN-NIERENBERG, P., DALY, J., GUROFF, G., CHILDSEY, CH. and WITKOP, B.: Intramolecular migration of deuterium and tritium during enzymic hydroxylation of p-deuteroacetanilide and p-tritioacetanilide. Arch. Biochem. Biophys. 120, (1967): 413

35. ULLRICH, V. und STAUDINGER, H.J.: In Biochemie des Sauerstoffs. 19. Coll. der Gesellschaft für biol. Chemie, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1968): 241 ff

36. VAN STRATUM, P.G.C.: The toxicity of the citrus-fungistate biphenyl. A literature review and evaluation. Central Inst. for Nutrition and Food Res., Rep. Nr. R 1838 Zeist (1964)

37. WEST, H.D., LAWSON, J.R., MILLER, J.H. and MATHURA, G.R.: The fate of diphenyl in the rat. Arch. Biochem. Biohysics. 60, (1956): 14

38. WILLIAMS, R.T.: Detoxication mechanism. 2. Auflage, Chapman and Hall Ltd. London (1959)

Danksagung

Herrn Professor Dr. Robert Ammon möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas danken.
Meinem lieben Freund und unermüdlichen Lehrer Herrn Dr. Peter Raig bin ich für seine Anregungen und besonders für seine Kritik sehr zum Dank verpflichtet.
Auch meiner lieben Frau möchte ich hier für die Anfertigung der mühseligen Schreibarbeiten danken.

Lebenslauf

Am 2.4. 1943 wurde ich als zweites von drei Kindern des Ingenieurs Alfred Beschorner und seiner Ehefrau Josepha, geb. Hauth, in Trier geboren.

Von Oktober 1950 bis Ostern 1955 besuchte ich die Grundschule und danach das Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Trier, an dem ich im März 1966 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Am 17.7. 67 legte ich dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 25.3. 69 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im Wintersemester 1969 setzte ich mein Studium an der Universität des Saarlandes fort, wo ich am 72 mein ärztliches Staatsexamen bestand.

Seit dem 26. März 1970 bin ich mit Ursula Beschorner geb. Zimmermann verheiratet.

Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.